

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/31, 15/70, 15/62, C07K 14/32, C12N 1/21, A61K 39/07		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/28263
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	7. August 1997 (07.08.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00432		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 31. Januar 1997 (31.01.97)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 03 649.6 1. Februar 1996 (01.02.96) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: LUBITZ, Werner [AT/AT]; Schönbornstrasse 12/7, A-1080 Wien (AT). SLEYTR, Uwe [AT/AT]; Parhamerplatz 10, A-1170 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KUEN, Beatrix [AT/AT]; Kaiserstrasse 107/21, A-1070 Wien (AT). TRUPPE, Michaela [AT/AT]; Tulpenstrasse 6, A-4222 Luften- berg (AT). HOWORKA, Stefan [AT/AT]; Hietzinger Hauptstrasse 42d/b, A-1130 Wien (AT). RESCH, Stepanka [AT/AT]; Kranzgasse 7/28, A-1150 Wien (AT). SCHROLL, Gerhard [AT/AT]; Maria Hilferstrasse 110/6, A-1070 Wien (AT). SARA, Margit [AT/AT]; Watzekgasse 84, A-2230 Gänserndorf (AT).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).			
(54) Title: RECOMBINANT EXPRESSION OF S-LAYER PROTEINS			
(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE EXPRESSION VON S-LAYER-PROTEINEN			
(57) Abstract			
The invention concerns processess for the recombinant preparation of S-layer proteins in gram-negative host cells. In addition, the nucleotide sequence of a new S-layer gene and a process for preparation of modified S-layer proteins is disclosed.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen. Weiterhin werden die Nukleotidsequenz eines neuen S-Layer-Gens und Verfahren zur Herstellung modifizierter S-Layer-Proteine offenbart.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen.

10 Kristalline bakterielle Zelloberflächenlayer (S-Layer) bilden in vielen Eubakterien und den allermeisten Archaeobakterien die äußerste Zellwandkomponente (Sleytr et al. (1988), Crystalline Bacterial Cell Surface Layers, Springer Verlag Berlin; Messner und Sleytr, Adv.Mikrob.Physiol.33 (1992), 213-275). Die mei-
15 sten der gegenwärtig bekannten S-Layer-Proteine sind aus identischen Proteinen bzw. Glykoproteinen zusammengesetzt, die scheinbare Molekulargewichte im Bereich von 40 000 bis 220 000 aufweisen. Die Komponenten von S-Layern sind selbst-assemblierend und die meisten Gitter haben eine schräge (p2), quadra-
20 tische (p4) oder hexagonale (p6) Symmetrie. Die Funktionen von bakteriellen S-Layern sind immer noch nicht vollständig bekannt, aber aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche dürften die porösen kristallinen S-Layer hauptsächlich als Schutzhüllen, Molekularsiebe oder zur Förderung der Zelladhä-
25 sion und Oberflächenerkennung dienen.

Genetische Daten und Sequenzinformationen sind für verschiedene S-Layer-Gene aus Mikroorganismen bekannt. Eine Übersicht findet sich bei Peyret et al., Mol.Mikrobiol.9 (1993), 97-109.
30 Auf diese Daten wird ausdrücklich Bezug genommen. Die Sequenz des für das S-Layer-Protein von B.stearothermophilus PV72 kodierenden Gens sbsA und ein Verfahren zu dessen Klonierung sind bei Kuen et al. (Gene 145 (1994), 115-120) angegeben.

35 B.stearothermophilus PV72 ist ein gram-positives Bakterium, das mit einem hexagonal angeordneten S-Layer bedeckt ist. Die Hauptkomponente des S-Layer ist ein 128 kd-Protein, bei dem es

- 2 -

sich um das häufigste Protein in der Zelle mit einem Anteil von ungefähr 15% bezüglich der gesamten Proteinbestandteile handelt. Es sind verschiedene Stämme von *B. stearothermophilus* charakterisiert worden, die hinsichtlich des Typs von S-Layer-Gitter, dem Molekulargewicht und der Glykosilierung der S-Layer-Komponenten unterschiedlich sind (Messner und Sleytr (1992), supra).

Die deutsche Patentanmeldung P 44 25 527.6 offenbart den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt des S-Layer-Gens aus *B. stearothermophilus* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure kann operativ mit einer Protein-kodierenden Nukleinsäure verknüpft werden und zur rekombinanten Herstellung von Proteinen in einem Verfahren verwendet werden, bei dem man eine transformierte Wirtszelle bereitstellt, die Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung und Sekretion des davon kodierten Polypeptids führen, und das resultierende Polypeptid aus dem Kulturmedium gewinnt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise prokaryontische Organismen, insbesondere gram-positive Organismen der Gattung *Bacillus* genannt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die rekombinante Herstellung von S-Layer-Proteinen nicht nur in gram-positiven prokaryontischen Wirtszellen, sondern auch in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen möglich ist. Dabei bildet sich das S-Layer-Protein im Inneren der Wirtszelle nicht in Form von ungeordneten Einschlußkörpern, sondern unerwarteterweise in Form von geordneten monomolekularen Schichten.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit

- 3 -

einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt;
10 (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.

15 Unter dem Begriff "stringente Hybridisierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach Waschen bei 55°C, vorzugsweise 60°C, in einem wäßrigen Niedrigsalz-Puffer (z.B. 0,2 xSSC) noch auftritt (s. auch Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory
20 Manual).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen durchgeführt. Dabei wird überraschenderweise im Zellinneren eine geordnete S-Layer-Proteinstruktur
25 erhalten. Vorzugsweise werden als Wirtszellen Enterobakterien, insbesondere E.coli, verwendet. Besonders bevorzugt ist der E.coli-Stamm pop2125, der am 31.01.1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D 38124 Braunschweig unter dem Aktenzeichen DSM
30 10509 hinterlegt wurde.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Gewinnung rekombinanter S-Layer-Proteine eingesetzt werden. Hierzu verwendet man eine für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure, die
35 eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren. Diese Insertionen können einerseits nur für Peptide mit wenigen Aminosäuren, z.B. 1-25 Ami-

- 4 -

nosäuren, kodieren. Andererseits können die Insertionen auch für größere Polypeptide von z.B. bis zu 1000 Aminosäuren und vorzugsweise bis zu 500 Aminosäuren kodieren, ohne daß die Fähigkeit des S-Layer-Proteins zur Ausbildung einer korrekt gefalteten Struktur verlorenggeht. Neben den Insertionen kann das rekombinante S-Layer-Protein auch Aminosäuresubstitutionen, insbesondere Substitutionen einzelner Aminosäuren im Bereich der Insertionsorte sowie gegebenenfalls Deletionen einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von bis zu 30 Aminosäuren aufweisen.

Als Insertionsstellen für Polypeptid-kodierende Sequenzen bevorzugt sind Bereiche zwischen den Positionen 1-1200 und 2200-3000 der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz. Besonders bevorzugte Insertionsstellen sind die NruI-Schnittstelle an Position 582, die PvuII-Schnittstelle an Position 878, die SnaB-I-Schnittstelle an Position 917, die PvuII-Schnittstelle an Position 2504 und die PvuII-Schnittstelle an Position 2649. Die Insertion einer für Streptavidin kodierenden Nukleinsäuresequenz konnte bereits in die NruI-Schnittstelle an Position 581 gezeigt werden.

Die Peptid- oder Polypeptid-kodierenden Insertionen werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren, z.B. Arg, Lys, Asp oder Glu, oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, antigene, allergene oder immunogene Epitope, metallbindende Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel für eine Insertion in die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ist eine für Streptavidin kodierende Nukleotidsequenz. Auf diese Weise können universelle Trägermoleküle erhalten werden, die zur Ankopplung von biotinylierten Reagenzien und zum Nachweis in immunologisch n oder Hybridisierungstestverfahren geeignet sind.

Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für Insertionen sind antigene allergene oder immunogene Epitope, z.B. Epitope aus pathogenen Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Pilzen, Parasiten etc. und Viren, oder Epitope aus Pflanzen oder Epitope
5 gegen körpereigene Substanzen, z.B. Cytokine, sowie gegen Toxine, insbesondere Endotoxine. Besonders bevorzugte Beispiele für immunogene Epitope sind Epitope aus Herpesviren, wie etwa Herpesvirus 6 oder Pseudorabiesvirus (Lomniczi et al., J. Virol. 49 (1984), 970-979), insbesondere Epitope aus
10 den Genen gB, gC oder/und gD, oder Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV), insbesondere Epitope aus den Genabschnitten, die für VP1, VP2 oder/und VP3 kodieren. Die immunogenen Epitope können so ausgewählt werden, daß sie die Erzeugung einer Antikörpervermittelten Immunreaktion fördern oder/und die Erzeugung
15 einer zellulären Immunreaktion, z.B. durch Stimulation von T-Zellen, fördern. Beispiele für geeignete allergene Epitope sind Birkenpollenallergene, z.B. Bet v I (Ebner et al., J. Immunol. 150 (1993) 1047-1054). Weiterhin besonders bevorzugt sind antigene Epitope, die in der Lage sind, aus Serum oder
20 anderen Körperflüssigkeiten körpereigene oder körperfremde Substanzen wie etwa Cytokine oder Toxine zu binden und herauszufiltrieren. Derartige Epitope können Bestandteile von Cytokin- oder Toxinrezeptoren oder von Antikörpern gegen Cytokine oder Toxine umfassen.

25

Andererseits können die Insertionen auch für Enzyme kodieren. Bevorzugte Beispiele sind Enzyme zur Synthese von Polyhydroxybuttersäure, z.B. PHB-Synthase. Durch Einbau von PHB-Synthase in den S-Layer kann bei Zufuhr des Substrats Hydroxybutter-
30 säure unter geeigneten Bedingungen eine molekulare Spinndüse entstehen. Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für ein Enzym ist bakterielle Luciferase. Hier kann bei Zufuhr des Enzymsubstrates, eines Aldehyds, und in Anwesenheit von O₂ ein molekularer Laser erhalten werden.

35

Ebenfalls bevorzugt sind Insertionen, die für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren ko-

dieren. Diese Moleküle können beispielsweise in Kombination mit immunogenen Epitopen zur Herstellung von Vakzinen verwendet werden.

- 5 Schließlich sind auch Insertionen bevorzugt, die für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein-A oder Protein-G oder für DNA- oder/und metallbindende Epitope, wie etwa Leucin-Zipper, Zinkfinger etc. kodieren.
- 10 So wird durch die vorliegende Erfindung erstmals eine Zelle bereitgestellt, die im Cytoplasma immobilisierte rekombinante Polypeptide in nativer Form, z. B. aktive Enzyme enthält. Pro m^2 rekombinanten S-Layer können auf diese Weise 50.000 - 200.000, z. B. ca. 100.000 rekombinante Moleküle immobilisiert
- 15 werden. Pro kg rekombinante E.coli Zellen können bis zu 3.000 m^2 S-Layer erhalten werden.

Vorzugsweise wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure in operativer

20 Verknüpfung mit einer für ein Signalpeptid von gram-positiven Bakterien kodierenden Nukleinsäure verwendet, d.h. 5'-seitig von der S-Layer-Protein-kodierenden Nukleinsäure ist die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure angeordnet. Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß die Anwesenheit derarti-

25 ger Signalpeptidsequenzen, die in den erfindungsgemäß verwendeten gram-negativen Wirtszellen nicht abgespalten werden, die Stabilität der S-Layer-Strukturen verbessern kann. Besonders bevorzugt umfaßt die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID

30 NO.1 dargestellten Nukleotidsequenz, (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% homologe Nukleotidsequenz.

35

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein

kodiert und ausgewählt ist aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der
5 Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

10

In SEQ ID NO.1 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens *sbsA* aus *B.stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts gezeigt. Der Signalpeptid-kodierende Abschnitt reicht von Position 1-90 der in SEQ ID
15 NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz. Der für das reife *SbsA*-Polypeptid kodierende Abschnitt reicht von Position 91-3684.

Das *sbsA*-Gen von *B.stearothermophilus* kodiert für ein Protein mit insgesamt 1228 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen
20 Signalpeptids mit 30 Aminosäuren (SEQ ID NO.2). Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Das Signalpeptid weist eine basische aminoterminal Domäne, gefolgt von einer hydrophoben Domäne, auf.

25

Sequenzvergleiche mit anderen Signalpeptiden zeigen eine gewisse Homologie zu Signalpeptiden von extrazellulären Proteinen in Bazillen, wie etwa alkalische Phosphatase und neutrale
30 Phosphatase von *B.amyloliquefaciens* (Vasantha et al., J.Bacteriol.159 (1984), 811-819) sowie mit den Signalpeptiden für das *B.sphaericus*-Gen 125 (Bowditch et al., J.Bacteriol.171 (1989), 4178-4188) und das OWP-Gen von *B.brevis* (Tsuboi et al., J.Bacteriol.168 (1986), 365-373).

35 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Der Vektor ist vorzugsweise

in Prokaryonten replizierbar. Besonders bevorzugt ist der Vektor ein prokaryontisches Plasmid.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
5 eine Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäure oder einem rekombinanten Vektor gemäß vorliegender Erfindung transformiert ist. Vorzugsweise ist die Zelle ein gram-negativer prokaryontischer Organismus und am meisten bevorzugt eine E.coli-Zelle. Die erfindungsgemäße Zelle kann in ihrem Inneren eine rekombinante S-Layerstruktur enthalten. Verfahren zur Transformation
10 von Zellen mit Nukleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik (siehe Sambrook et al., supra) und brauchen daher nicht erläutert zu werden.

15 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes S-Layer-Protein, das innerhalb der in SEQ ID NO.2 gezeigten Aminosäuresequenz mindestens eine Peptid- oder/und Polypeptidinsertion enthält. Bevorzugte Beispiele für Peptid- und Polypeptidinsertionen wurden bereits erläutert.

20 Aus erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur assembliert werden, die als Untereinheit mindestens ein erfindungsgemäßes rekombinantes S-Layer-Protein enthält. Weiterhin ist bevorzugt, daß
25 die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur als "Verdünnungsmoleküle" auch nichtmodifizierte S-Layer-Proteine enthält. Die nichtmodifizierten S-Layer-Proteine liegen vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10-99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

30 Die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur kann mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfassen. Kovalente Verknüpfungen können beispielsweise durch Insertionen von Cysteinresten und einer anschließenden Aus-
35 bildung von Cystinbrücken eingeführt werden. Verknüpfungen durch Affinitätsbindung umfassen beispielsweise Antikörper-

Antigen-, Antikörper-Protein A- bzw. -Protein G- oder Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen.

S-Layer-Strukturen, die rekombinante S-Layer-Proteine enthalten, können gegebenenfalls auch in trägergebundener Form hergestellt werden. Hierzu kann die Reassemblierung der S-Layer-Struktur aus einzelnen Einheiten in Gegenwart eines Peptidoglycanträgers erfolgen, wobei beispielsweise Peptidoglycanschichten erzeugt werden, die auf einer oder auf beiden Seiten mit einer S-Layer-Struktur überzogen sind. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung trägergebundener S-Layer-Strukturen besteht darin, eine S-Layer-Schicht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien, z.B. Wasser/Luft, zu erzeugen und diese Schicht auf einer Festphase, z.B. einer Filtermembran, zu immobilisieren (vgl. z.B. Pum und Sleytr (1994), Thin Solid Films 244, 882-886; Küpcü et al. (1995), Biochim. Biophys. Acta 1235, 263-269).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen sind für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans, wobei man rekombinante S-Layer-Proteine verwendet, die immunogene Epitope von Pathogenen und/oder körpereigene immunstimulierende Polypeptide, wie etwa Cytokine, enthalten. Bei dieser Anwendung ist nicht unbedingt eine Reinigung der rekombinanten S-Layer-Proteine erforderlich. Stattdessen kann beispielsweise die Verwendung in Kombination mit einem Bakterienghost erfolgen, der ggf. in seiner Membran zusätzliche immunogene Epitope enthält.

Die Herstellung geeigneter "Bakterienghosts" ist beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP91/00967 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Dort werden modifizierte Bakterien offenbart, erhältlich durch Transformation eines gram-negativen Bakteriums mit dem Gen eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bakteriophagen, mit dem Gen eines lytisch wirkenden Toxin-Freisetzungsproteins oder mit

Genen, die Teilsequenzen davon, die für lytische Proteine kodieren, enthalten, Kultivierung des Bakteriums, Expression dieses Lyse-Gens und Isolierung des resultierenden Bakterienghosts aus dem Kulturmedium.

5
An die Membran dieser Bakterien kann, wie im europäischen Patent 0 516 655 beschrieben, ein rekombinantes Protein gebunden sein, das durch Expression einer rekombinanten DNA in diesen gram-negativen Bakterien erhältlich ist. Diese rekombinante DNA umfaßt eine erste DNA-Sequenz, welche für eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne, die eine α -helikale Struktur besitzt und aus 14-20 Aminosäuren besteht, die N- und C-terminal von je 2-30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein können, kodiert. Mit dieser ersten DNA-Sequenz in operativer Verknüpfung befindet sich 10 eine zweite DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes rekombinantes Protein kodiert. Weiterhin enthält das gram-negative Bakterium eine dritte DNA-Sequenz, die unter einer von den ersten und zweiten DNA-Sequenzen getrennten Kontrolle steht und für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-Freisetzungsprotein oder für deren lytisch wirkende Teile kodiert. Durch Expression und Lyse derartiger rekombinanter, gram-negativer Bakterien werden sog. "Bakterienghosts" erhalten, die eine intakte Oberflächenstruktur mit an die Oberfläche gebundenen immunogenen Epitopen 25 enthalten.

Bei Kombination dieser Baktienghosts mit erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layern können Vakzine und Adjuvantien erzeugt 30 werden, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

Eine weitere besonders bevorzugte Verwendung für rekombinante S-Layer-Proteine und S-Layer Strukturen ist die Verwendung als Enzymreaktor. Ein solcher Enzymreaktor kann beispielsweise von einer Zelle gebildet werden, die in ihrem Inneren eine erfindungsgemäße rekombinante S-Layer-Struktur enthält. Andererseits kann der Enzymreaktor auch aus isolierten und in vitro 35

reassemblierten S-Layer-Strukturen oder Kombinationen verschiedener S-Layer-Strukturen gebildet werden.

Es wurde festgestellt, daß das gram-positive Bakterium *B. stearothermophilus* PV72 neben SbsA noch ein weiteres S-Layer-Protein enthält, das in der Folge als SbsB bezeichnet wird. (Sara und Sleytr (1994), J. Bacteriol. 176, 7182-7189). Durch Amplifikation unter Verwendung geeigneter Nukleinsäureprimer konnte das sbsB-Gen isoliert und charakterisiert werden. In SEQ ID NO.5 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsB aus *B. stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts, der von Position 1-93 der Nukleinsäuresequenz reicht, gezeigt. In SEQ ID NO.6 ist die davon abgeleitete Aminosäuresequenz gezeigt. Das sbsB-Gen kodiert für ein Protein mit insgesamt 921 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 31 Aminosäuren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Ebenso wie beim sbsA-Gen kann auch beim sbsB-Gen innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine für ein Peptid oder Polypeptid kodierende Nukleinsäureinsertion eingefügt werden. Bezüglich bevorzugter Beispiele für Insertionen im sbsB-Gen wird auf die zuvor gemachten Ausführungen hinsichtlich des sbsA-Gens verwiesen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines sbsB-Gens gegebenenfalls mit Insertion enthält. Dieser Vektor kann in Eukaryonten, Prokaryonten oder in Eukaryonten und Prokaryonten replizierbar sein. Er kann in ein das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor oder ein Vektor sein, der extrachromosomal vorliegt. Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Vektor ein Plasmid, insbesondere ein prokaryontisches Plasmid.

- 10 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem sbsB-Gen transformiert ist, wobei das sbsB-Gen gegebenenfalls eine Insertion enthalten kann. Die Wirtszelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Vorzugsweise ist die Zelle
15 ein prokaryontischer Organismus. Sowohl gram-positive Organismen, z.B. Organismen der Gattung Bacillus, als auch gram-negative Organismen, wie etwa Enterobakterien, insbesondere E.coli, sind bevorzugt. Verfahren zur Transformation von eukaryontischen und prokaryontischen Zellen mit Nukleinsäuren sind
20 bekannt und brauchen daher nicht ausführlich erläutert werden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein SbsB-Protein, d.h. ein S-Layer-Protein, das von einer Nukleinsäure, wie vorstehend definiert kodiert ist. Besonders bevorzugt sind
25 rekombinante SbsB-Proteine, die eine oder mehrere Peptid- oder/und Polypeptidinsertionen innerhalb der sbsB-Sequenz enthalten. Besonders bevorzugt weist der SbsB-Anteil eines erfindungsgemäßen Polypeptids eine Homologie von mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% zu der in SEQ ID NO.6
30 gezeigten Aminosäuresequenz auf.

Auch aus den rekombinanten SbsB-S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur entsprechend der rekombinanten SbsA-S-Layer-Struktur assembliert werden. In dieser
35 Struktur liegen die nichtmodifizierten S-Layerproteine vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10-99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

Auch die Anwendungen der erfindungsgemäßen rekombinanten sbsB-S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen entsprechen den vorstehend für SbsA genannten Anwendungen. Insbesondere ist dabei die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans bzw. als Enzymreaktor s bemerkenswert.

Rekombinante S-Layer-Proteine sind erhältlich durch ein Verfahren, bei dem man

- (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält,
- (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen, und
- (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird ein rekombinantes SbsA-S-Layer-Protein hergestellt, d.h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID No.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird ein rekombinantes SbsB-S-Layer-Protein hergestellt, d.h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
 - 5 (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
 - (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
- 10

Neben den rekombinanten SbsA und SbsB-S-Layer-Proteinen aus *B.stearothermophilus* können jedoch auch rekombinante S-Layer-Proteine aus anderen Organismen (vgl. z.B. Peyret et al.,
15 (1993), supra) hergestellt werden.

Die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine kann einerseits in einer heterologen Wirtszelle erfolgen, d.h. in einer Wirtszelle, die ursprünglich kein S-Layer-Gen enthält. Beispiele für solche heterologen Wirtszellen sind gram-negative
20 prokaryontische Organismen, wie etwa *E.coli*.

Die heterologe Expression von S-Layer-Proteinen kann jedoch auch in gram-positiven prokaryontischen Organismen, wie etwa
25 *B. subtilis*, erfolgen. Hierzu werden vorzugsweise Integrationsvektoren verwendet, die ein natives oder/und ein rekombinantes S-Layer-Gen enthalten. Bei Verwendung der nativen Signalsequenzen wird eine Sekretion der S-Layer-Proteine in den Kulturüberstand gebunden.

30 Oft ist jedoch die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine in homologen Wirtszellen bevorzugt, d.h. in Wirtszellen, die ursprünglich ein natürliches S-Layer-Gen enthalten. In einer Ausführungsform dieser homologen Expression wird das
35 rekombinante S-Layer-Gen in die Wirtszelle so eingeführt, daß die Wirtszelle noch in der Lage ist, ein weiteres S-Layer-Gen zu exprimieren, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein

kodiert. Vorzugsweise ist das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der homologen Expression ist eine
5 B.stearothermophilus PV72 Zelle, welche intakte natürliche sbsA- oder/und sbsB-Gene enthält, und die mit einem Plasmid transformiert ist, welches ein rekombinantes S-Layer-Gen enthält.

10 In einer zweiten Ausführungsform kann die homologe Expression in einer Wirtszelle erfolgen, in der das ursprünglich vorhandene intakte S-Layer-Gen inaktiviert wurde. Folglich wird in dieser Ausführungsform in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen mehr exprimiert, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem
15 rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein spezifisches Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine B.stearothermophilus PV72 Zelle, in deren Genom z.B. durch homologe Rekombination ein für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodierendes Gen eingeführt wurde, welches das ursprüngliche S-Layer-Gen ersetzt. Ein weiterer Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine B.stearothermophilus-Zelle, in der das native S-Layer-Gen z.B. durch ortsspezifische Mutagenese oder/und homologe Rekombination inaktiviert wurde und die mit einem ein rekombinantes S-Layer-Gen
20 enthaltenden Vektor transformiert ist.

Bei der homologen Expression rekombinanter S-Layer-Gene werden als Wirtszellen üblicherweise gram-positive prokaryontische
30 Organismen verwendet. Besonders bevorzugt als Wirtszelle ist B.stearothermophilus PV72, der bei hoher Temperatur in einem definierten synthetischen Medium (Schuster et al., (1995), Biotechnol. and Bioeng. 48: 66-77) kultiviert werden kann.

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen:

- 5 SEQ ID NO.1 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsA von *B.stearothermophilus*;
- SEQ ID NO.2 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;
- SEQ ID NO.3 die Nukleotidsequenz des Primers T5-X;
- SEQ ID NO.4 die Nukleotidsequenz des Primers E;
- 10 SEQ ID NO.5 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsB von *B.stearothermophilus*;
- SEQ ID NO.6 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;
- SEQ ID NO.7 die Nukleotidsequenz eines Teilfragments des
- 15 Streptavidingens;
- SEQ ID NO.8 die Nukleotidsequenz des Primers NIS 2AG;
- SEQ ID NO.9 die Nukleotidsequenz des Primers LIS C3;
- Fig.1 eine schematische Darstellung des zur Herstellung des rekombinanten Vektors pBK4 verwendeten
- 20 sbsA PCR-Fragments;
- Fig.2 eine schematische Darstellung von Peptidinsertionen in die Aminosäuresequenz des SbsA S-Layer-Proteins und
- Fig.3 eine schematische Darstellung von Aminosäuresubstitutionen und -insertionen in rekombinanten
- 25 S-Layer-Proteinen.

BEISPIELE:

30 1. Bakterienstämme, Medien und Plasmide

Gram-positive Bakterien des Stammes *Bacillus stearothermophilus* PV72 wurden bei 58°C in SVIII-Medium (Bartelmus und Perschak, *Z.Zuckerind.* 7 (1957), 276-281) kultiviert. Bakterien

35 des Stammes *E.coli* pop2135 (*endA*, *thi*, *hsdR*, *malT*, *cI857*, λ pR, *malPQ*) wurden in LB-Medium kultiviert (Sambrook et al., (1989), *supra*). Zur Selektion von Transformanten wurde Ampicillin

cillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium zugegeben. Das Plasmid pPLcAT10 (λpL, bla, colE1) (Stanssens et al., Gene 36 (1985), 211-223) wurde als Klonierungsvektor verwendet.

5

2. Manipulation von DNA-Fragmenten

Restriktionsanalyse von DNA, Agarosegelelektrophorese und Klonierung von DNA-Fragmenten wurden nach den bei Sambrook et al. (1989), supra, beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

Die Transformation von kompetenten Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung eines Bio-Rad Genepulsers (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalif., USA) nach Protokollen des Herstellers.

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert. Chromosomale DNA wurde gemäß der bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology (1987), New York, John Wiley) beschriebenen Verfahren isoliert.

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, New England Biolabs oder Stratagene bezogen und gemäß den Vorschriften der Hersteller eingesetzt.

3. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen der 5'- und 3'-Regionen (einschließlich des für die Signalsequenz kodierenden Bereichs) des Gens sbsA im Vektor pPLcAT10 wurde nach der Dideoxykettenterminationsmethode von Sanger et al. bestimmt. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden auf Basis der bereits publizierten sbsA-Sequenz (Kuen et al., Gene 145 (1994), 115-120) konstruiert.

4. PCR-Amplifikation von sbsA

Die PCR-Amplifikation des sbsA-Gens erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l, in dem 200 μ M Deoxynukleotide, 1U
5 Pfu-Polymerase (Stratagene), 1x Pfu-Reaktionspuffer, jeweils
0.5 μ M Oligonukleotidprimer und 100 ng genomischer DNA aus
B.stearothermophilus als Matrize vorhanden waren. Die Amplifikation wurde über 30 Zyklen in einem Thermocycler (Biomed Thermocycler 60) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem
10 Denaturierungsschritt von 1,5 min bei 95°C, einem Annealing-
schritt von 1 min bei 56°C und 1 min bei 50°C sowie einem
Extensionsschritt von 2 min bei 72°C.

Als Primer wurden der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO.3
15 angegebene Primer T5-X, der den 5'-Bereich von sbsA flankiert
und eine XbaI-Stelle enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in
SEQ ID NO.4 gezeigte Primer E verwendet, der die 20 Nukleotide
stromabwärts gelegene Region des Transkriptionsterminators der
sbsA-Sequenz flankiert und eine BamHI-Stelle enthält.

20 Die PCR-amplifizierten Produkte wurden auf einem 0.8% Agarose-
gel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Klonierung unter
Verwendung des Systems von Gene Clean (BIO101 La Jolla, Ka-
lif., USA) zur Klonierung gereinigt.

5. Klonierung des sbsA-Gens in den Vektor pPLcAT10

Das durch PCR gewonnene sbsA-Gen mit einer Länge von 3,79 kb
wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und
30 BamHI gespalten. Das resultierende XbaI-BamHI-Fragment wurde
in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pPLcAT10
kloniert, so daß das sbsA-Gen unter transkriptioneller Kon-
trolle des stromaufwärts gelegenen pL-Promotors war. Das ATG-
Startkodon der sbsA-Sequenz wurde durch die Klonierungsprozedur
35 rekonstruiert. Die klonierte sbsA-Sequenz enthielt die N-ter-
minale Signalsequenz von sbsA und endete 20 nt nach dem Trans-
kriptionsterminator. Nach Ligation der Vektor-DNA mit dem

sbsA-Fragment wurde der E.coli-Stamm pop2135 durch Elektrottransformation transformiert. Die resultierenden Klone wurden einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen. Ein positiver Klon wurde sequenziert, um die korrekten Sequenzübergänge an den 5'- und 3'-Enden zu verifizieren. Dieser Klon wurde als pBK4 bezeichnet.

Eine schematische Darstellung des 3,79 kb XbaI sbsA-Fragments und seine Lokalisierung in der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pBK4 ist in Fig.1 dargestellt (Abkürzungen: tT: Transkriptionsterminator; ori: Ursprung der DNA-Replikation; amp: Ampicillinresistenzgen).

6. Rekombinante Expression des sbsA-Gens in E.coli

E.coli pop2135/pBK4-Zellen wurden bei 28°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Dann wurde die Expression von sbsA durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 28°C auf 42°C induziert. 1,5 ml Aliquots wurden vor bzw. 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression entnommen. Als Kontrollen wurden E.coli pop2135/pPLCAT10 (kultiviert unter den gleichen Bedingungen) und B.stearothermophilus PV72 verwendet.

Kulturüberstände und Zellextrakte aus allen Proben wurden auf die Expression des S-Layer-Proteins durch SDS-PAGE und Western-Immunoblotting untersucht.

In Extrakten aus mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen wurde eine zusätzliche starke Proteinbande mit dem gleichen Molekulargewicht wie das Wildtyp-SbsA-Protein gefunden. Es wurden keine Abbauprodukte von SbsA selbst in einem Zeitraum bis zu 5 Stunden nach der Induktion der Expression gefunden. Dies läßt vermuten, daß das S-Layer-Protein sbsA in E.coli stabil ist und nicht durch Proteasen abgebaut wird.

Es wurde eine densitometrische Bestimmung der relativen Menge an SbsA-Protein durchgeführt. Zu einem Zeitpunkt von 4 Stunden nach der Induktion lag das sbsA-Protein in einem Anteil von ca. 16% bezüglich des gesamten zellulären Proteins vor.

5 Das in E.coli erzeugte SbsA-Protein wanderte im SDS-Gel etwas langsamer als das natürliche SbsA-Protein aus B.stearothermophilus. Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des SbsA-Proteins durch Edman-Abbau schlugen aufgrund
10 einer Blockierung des N-Terminus fehl. Dies läßt vermuten, daß die Signalsequenz in E.coli nicht abgespalten wurde.

Auch eine Western Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen von E.coli/pBK4 ergab nur eine einzige sbsA-
15 spezifische Proteinbande mit einem etwas höheren Molekulargewicht als das Wildtyp-SbsA-Protein aus stearothermophilus.

Für den Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen Antiserum gegen SbsA aus Kaninchen inkubiert. Die Herstellung dieses
20 Antiserums ist bei Egelseer et al. (J.Bacteriol.177 (1995), 1444-1451) beschrieben. Zum Nachweis gebundener SbsA-spezifischer Antikörper wurde ein Konjugat aus Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase verwendet.

25 Aus Überständen von mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen konnte auch nach Induktion der sbsA-Gen-Expression kein SbsA-Protein nachgewiesen werden. Daraus ist ersichtlich, daß SbsA nicht in das umgebende Medium exportiert wird.

30 7. Lokalisierung und Organisation des S-Layer-Proteins SbsA im Cytoplasma von E.coli

Zellen aus E.coli pop2135/pBK4, die aus Kulturen mit 1, 2, 3
35 und 5 Stunden nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, wurden auf die intrazelluläre Organisation von sbsA untersucht. Nichtinduzierte, bei 28°C kultivierte

Zellen und Zellen von *B.stearothermophilus* PV72 wurden als Kontrollen untersucht.

Hierzu wurden gesamte Zellen beider Organismen fixiert und in Spurrharz nach der Methode von Messner et al. (Int.J.Syst.Bacteriol.34 (1984), 202-210) fixiert und eingebettet. Anschließend wurden ultradünne Schnitte der eingebetteten Präparate hergestellt und mit Uranylacetat angefärbt.

Das Cytoplasma von nichtinduzierten *E.coli*-Zellen zeigte die typische granuläre Struktur, die sich auch bei einer Zunahme der OD der Suspensionen nicht änderte. Längsschnitte von *E.coli*-Zellen, die 1 Stunde nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, zeigten parallele, blattartige Strukturen im Cytoplasma. Aus Querschnitten wurde ersichtlich, daß diese Strukturen eine konzentrische Anordnung zeigten.

Der Anteil blattartiger Strukturen zeigte einen deutlichen Anstieg zwischen 1 und 2 Stunden nach Induktion der *sbsA*-Expression und blieb danach im wesentlichen konstant.

Das in *E.coli* rekombinant hergestellte *sbsA*-Protein konnte auch durch Immunogoldmarkierung mit *SbsA*-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Auch mit dieser Nachweismethode wurde eine geordnete Struktur des rekombinant hergestellten *SbsA*-Proteins gefunden.

Aus diesen morphologischen Daten war klar ersichtlich, daß das *SbsA*-Protein sich nicht zu unregelmäßigen Einschlußkörpern aggregierte, sondern monomolekulare S-Layer-Kristalle bildete. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der in *E.coli* assemblierten *SbsA*-S-Layer-Schichten war die konzentrische Anordnung in definierten Abständen. Das Vorhandensein der Signalsequenz störte die korrekte Assemblierung nicht.

8. Herstellung von rekombinanten sbsA-S-Layer-Genen

8.1 Insertion einer 6 bp langen DNA-Sequenz

5 Für die ortsspezifische Insertionsmutagenese des sbsA-Gens wurde eine modifizierte Kanamycinkassette (1,3 kb) verwendet, die durch Spaltung des Plasmids pWJC3 (erhalten von W.T. McAllister, New York) durch SmaI isoliert wurde. Die Kassette wurde in fünf verschiedene glattendige Restriktionsstellen des
10 sbsA-Gens ligiert, nämlich in die NruI-Stelle an Position bp 582 (pSL582), in die SnaBI-Stelle an Position bp 917 (pSL917) und in jede der PvuII-Stellen an Position bp 878 (pSL878), bp 2504 (pSL2504) und bp 2649 (pSL2649). Nach Selektion von Kanamycin-resistenten Klonen wurde die Kassette aus der Insertionsstelle durch Spaltung mit ApaI, gefolgt von einer Religa-
15 tion des S-Layer-Plasmids pBK4, entfernt. Durch die Herausschneide- und Religationsprozedur blieb eine Insertion von 6 bp CCCGGG (ApaI Restriktionsstelle) zurück. Das System dieser Linkerinsertion ist schematisch in Fig.2 dargestellt.

20

Die resultierenden rekombinanten S-Layer-Gene kodieren für modifizierte, um 2 Aminosäuren verlängerte sbsA-Proteine.

Die konkreten Änderungen in der Primärstruktur der sbsA-Proteine sind in Fig.3 gezeigt. Im Klon pSL582 führte die Inser-
25 tion zur Einfügung von Glycin und Prolin zwischen den Aminosäuren 194 und 195 am N-Terminus des SbsA-Proteins. Die Aminosäuren Alanin und Arginin wurden im Klon pSL917 zwischen die Aminosäuren 306 und 307 eingefügt. Im Klon pSL2649 wurde eine
30 Insertion von Glycin und Prolin zwischen die Aminosäuren an den Positionen 883 und 884 eingefügt. Eine Insertion von Alanin und Prolin zwischen den Aminosäuren 293 und 294 wurde im Klon pSL878 erhalten. Weiterhin wurde das Alanin an Position 293 durch Glycin ausgetauscht. Im Klon pSL2504 wurden die
35 Aminosäuren Alanin und Prolin zwischen die Aminosäuren 835 und 836 eingeführt und das Alanin an Position 835 durch Glycin ersetzt.

Alle durch Insertionsmutagenese erhaltenen Klone behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layer-Proteins.

Um die Fähigkeit der modifizierten Proteine zur Assemblierung
s in S-Layer-Strukturen nachzuweisen, wurden gemäß der unter
Punkt 7. beschriebenen Prozedur ultradünne Längsschnitte von
gesamten Zellen, die 4h unter induktiven Bedingungen kultiviert
worden waren, hergestellt. Es wurde gefunden, daß das Cytoplasma
aller 5 Klone mit parallelen, blattartigen Strukturen gefüllt
10 ist, welche der Krümmung der Zellpole folgen. Es gab keine
morphologischen Unterschiede des Cytoplasma bei den 5 untersuchten
verschiedenen Klonen. Es wurden genau die gleichen blattartigen
Strukturen wie bei der Assemblierung des Wildtyp-SbsA-Protein in
E.coli (Punkt 7.) festgestellt.

15

8.2 Insertion einer für Streptavidin kodierenden DNA-Sequenz

Um zu untersuchen, ob auch die Insertion größerer Proteinsequenzen
in das SbsA-Protein toleriert werden kann, wurde ein
20 mit ApaI-Linkern versehenes, für einen Teil von Streptavidin
(160 Aminosäuren) kodierendes DNA-Fragment (SEQ ID No. 7) in die
ApaI-Restriktionsstelle der in Beispiel Seite 1 hergestellten
sbsA Klone pSL582, pSL878, pSL917 und pSL2649 Gen inseriert.
Die Insertion der Streptavidinsequenz erfolgte bei
25 SL582 im Codon 197, bei pSL878 zwischen Codon 295 und 296, bei
pSL917 zwischen Codon 308 und 309 und bei pSL2649 in Codon 886.
Die Expression von SbsA-Streptavidin-Fusionsproteinen konnte bei
allen Konstrukten durch SDS-Page und Immunoblots nachgewiesen
werden. Durch EM-Analyse wurde festgestellt, daß
30 eine Selbstassemblierung der S-Layerstruktur bei den Fusionsproteinen
mit Insertionen im Codon 197 und zwischen den Codons 295 und 296
möglich war.

Die SbsA-Streptavidin-Fusionsproteine können als Monomere
35 liert und zu homogenen SbsA-Streptavidin S-Layern oder zu
gemischten SbsA-Streptavidin/SbsA-S-Layern reassembliert werden.
Sie können zur Bindung biotinylierter Substanzen sowie zur

Bestimmung der Bindekapazität von Enzymen und anderen gebundenen Molekülen eingesetzt werden.

8.3 Insertion einer für BetvI kodierenden DNA-Sequenz

5 Eine für den offenen Leserahmen von BetvI (161 Aminosäuren), das Hauptpollenallergen der Birke, kodierende DNA Sequenz (Ferreira et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 19574-19580) wurde an der ApaI-Stelle in den sbsA-Klon pSL878 inseriert. Es
10 konnte die Expression eines SbsA-BetvI-Fusionsproteins nachgewiesen werden, das eine immunologisch aktive BetvI-Domäne enthält.

Das resultierende Fusionsprotein kann für therapeutische oder
15 diagnostische Zwecke eingesetzt werden. So kann durch Verabreichung des Fusionsproteins versucht werden, eine T_H2 -gerichtete IgE-Antikörperreaktion in eine T_H1 -vermittelte Reaktion gegen BetvI umzuwandeln. Auf diese Weise kann das Auftreten der Symptome einer Pollenallergie unterdrückt werden. Weiter-
20 hin können SbsA-BetvI Fusionsproteine zum Test von Anti-BetvI-Antikörperkonzentrationen oder/und zur Verringerung hoher Konzentrationen an Anti-BetvI-IgE verwendet werden.

8.4. Insertion für ein Pseudorabies Virus Antigen kodierender 25 DNA-Sequenz

Es wurde eine Insertion der für das gB Epitop SmaBB (255 Aminosäuren) kodierenden DNA-Sequenz (Nucleotide 489-1224 entsprechend den Koordinaten gemäß EMBL-Seq: HEHSSGP2) von Pseudorabiesvirus in die SSpI-Stelle des sbsA-Gens nach nt 3484
30 (zwischen Codon 1161 und 1162) durchgeführt. Es konnte die Expression von SbsA-SmaBB Fusionsproteinen nachgewiesen werden.

Die Fusionsproteine können zum Testen gB-spezifischer Immun-
35 reaktionen verwendet werden. Eine Westernblot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper, welcher der inserierten Sequenz

entspricht, zeigte die immunologische Aktivität der viralen Domäne innerhalb der rekombinanten SbsA-SmaBB Proteine.

8.5 Insertion einer für PHB-Synthase (PhbC) von *Alcaligenes eutrophus* H16 kodierenden DNA-Sequenz

Eine regelmäßige Anordnung von Polypeptidstrukturen mit enzymatischer Aktivität an der Oberfläche von S-Layern ist ein wichtiges Ziel zur Herstellung immobilisierter Enzyme innerhalb einer lebenden Zelle und im Falle der 590 Aminosäuren langen PHB Synthase zur Herstellung einer molekularen Maschine für eine Biopolymersynthese.

Das phbC Gen wurde durch PCR aus dem Plasmid p4A (Janes et al., Molecular characterisation of the poly- β -hydroxy-butyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. In: Novel Biodegradable Microbial Polymers (HRSG. Daves, E. A.), pp 175-190 (1990), Kluwer, Dordrecht) als 1770 nt langes DNA-Fragment (entsprechend einem offenen Leserahmen von 590 Aminosäuren) isoliert und in die ApaI-Schnittstelle des sbsA-Klons pSL878 inseriert, wobei das Plasmid pSbsA-PhbC erhalten wurde. In einer mit diesem Plasmid transformierten E.coli Zelle konnte die Expression eines SbsA-PhbC-Fusionsproteins mit ca. 195 kD nachgewiesen werden. Bei Insertion von 2 Kopien des phbC-Gens hintereinander in die ApaI-Stelle von pSL878 konnte die Expression eines Fusionsproteins mit ca. 260 kD nachgewiesen werden.

Für einen funktionellen Test der enzymatischen Aktivität des SbsA-PhbC Konstrukts wurden die E.coli Zellen, die das Plasmid pSbsA-PhbC enthielten, mit dem Plasmid pUMS cotransformiert, welches die β -Ketothiolase (PhbA) und die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhbB) von *A. eutrophus* (Kalousek et al., Genetic engineering of PHB-synthase from *Alcaligenes eutrophus* H16. In: Proceedings of the International Symposium on Bacterial Polyhydroxy-alkanoates, pp 426-427 (1993), HRSG. Schlegel H. G., Steinbüchel A. Goltze Druck, Göttingen) enthält. Die Poly-

β -hydroxybutyrat-Bildung in den cotransformierten E.coli Zellen konnte durch Anfärbung mit Sudanschwarz, Gaschromatographie und Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen, daß das SbsA-PhbC-Konstrukt enzymatisch aktiv ist und erfolgreiches Beispiel zur Immobilisierung von Enzymen auf intrazellulären S-Layer-Matrizen darstellt.

8.6 Insertion einer für ein bakterielles Luciferasegen codierenden DNA-Sequenz

10

Ein monocistronisches LuxAB Gen mit einer Länge von 2.070 nt, welches ein aus den beiden Untereinheiten LuxB und LuxA der bakteriellen Luciferase aus *Vibrio harveyi* bestehendes Fusionsprotein LuxAB enthält, wurde aus dem Plasmid pT7-mut3 (Boylan et al., J. Biol. Chem. 264 (1989), 1915-1918) durch PCR isoliert und in die ApaI Stelle des in Beispiel 8.1 hergestellten Klons pSL878 inseriert, wobei das Plasmid pBK878-LuxAB erhalten wurde. In einer mit diesem Plasmid transformierten E.coli Zelle konnte die Expression eines SbsA-PhbC Fusionsproteins mit ca. 207 kD nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins wurde durch die bei Boylan et al., Supra, beschriebene Methode gezeigt.

9. Isolierung und Charakterisierung des sbsB-Gens

Als Grundlage für die Isolierung des sbsB-Gens diente die Aminosäuresequenz des N-Terminus sowie die Sequenz von drei internen Peptiden des SbsB-Proteins. Von diesen Peptidsequenzen ausgehend wurden degenerierte Oligonukleotidprimer konstruiert und für die PCR eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein 1076 bp langes PCR-Fragment aus der chromosomalen DNA von *B.stearothermophilus* amplifiziert, kloniert und sequenziert (entsprechend Position 100-1176 der in SEQ ID NO.5 gezeigten Sequenz).

Für die Amplifikation der 5'- und 3'-seitigen Abschnitte des sbsB-Gens wurde die Methode der inversen PCR angewendet und

mit Hilfe verschiedener Primerkombinationen schrittweise überlappende DNA-Fragmente erhalten und sequenziert.

Zur Amplifizierung des vollständigen sbsB-Gens wurden als
5 Primer der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO.8 angegebene Primer NIS 2AG, der den 5'-Bereich von sbsB enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO.9 angegebene Primer LIS C3 verwendet, der den 3'-Bereich von sbsB enthält.

10 Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment, welches die in SEQ ID NO.5 gezeigte Nukleotidsequenz mit 5'- und 3'-BamHI-Restriktionsschnittstellen enthält, wurde wie im Beispiel 5 beschrieben in den Vektor pPLCAT10 kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des Lambda PL-Promotors erfolgte.

15 Weiterhin wurde das sbsB-PCR-Fragment mit 5'seitiger EcoRI- und 3'seitiger BamHI-Schnittstelle in den Vektor pUC18 kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des lac-Promotors erfolgte.

20 Der Nachweis der sbsB-Expression erfolgte wie in den Beispielen 6 und 7 beschrieben durch SDS-Gelelektrophorese und Elektronenmikroskopie.

25 10. Herstellung von rekombinanten sbsB-S-Layer-Genen

Analog der in Beispiel 8 beschriebenen Methoden wurden rekombinante sbsB Gene hergestellt.

30 So wurde gemäß der in Beispiel 8.1 beschriebenen Methode eine 6 nt lange, eine ApaI-Restriktionsschnittstelle enthaltende DNA-Sequenz an verschiedenen Positionen in das sbsB-Layer-Gen eingeführt. Auf diese Weise wurden die rekombinanten sbsB Klone pAK407, pAK481 und pAK1582 mit ApaI-Schnittstellen bei
35 nt 407 (Codon 136), 481 (Codon 161/162) und 1582. (Codon 528/529) erhalten. Diese durch Insertionsmutagene erhaltenen

Klone behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layerproteins und zur Ausbildung von S-Layerstrukturen.

Analog der in Beispiel 8.2 beschriebenen Methode wurde ein für Streptavidin kodierendes DNA-Fragment in die ApaI-Restriktionsstellen der sbsB-Klone pAK407 bzw. pAK481 eingeführt.

Analog Beispiel 8.4 wurde eine für das gB-Epitop SmaBB codierende DNA-Sequenz in die ApaI-Schnittstellen der sbsB Klone pAK481 und pAK1582 eingeführt. In den mit den resultierenden rekombinanten Plasmiden transformierten E.coli Zellen konnte die Expression von sbsB-SmaB Fusionsproteinen mit ca. 130 kD nachgewiesen werden. Bei Insertion von zwei Kopien des SmaBB Epitops hintereinander in die ApaI-Schnittstelle von pAK481 konnte die Expression eines Fusionproteins mit ca. 157 kD nachgewiesen werden. Die SmaBB Domänen der Fusionsproteine wurden von spezifischen Antikörpern erkannt.

Analog zu Beispiel 8.6 konnte bei Insertion der LuxAB Sequenz in die ApaI-Schnittstelle von pAK407 die Expression eines 175 kD SbsB-LuxAB Fusionproteins nachgewiesen werden.

11. Heterologe Expression von sbsA und sbsB in Bacillus subtilis

25

Zur heterologen Expression von sbsA und sbsB in B. subtilis wurde der Integrationsvektor pX (Kim, L., Mogk, A. und Schumann W., Gene 181 (1996), 71-76: A xylose-inducible Bacillus subtilis integration vector and its application) verwendet. In den resultierenden rekombinanten Expressionsvektoren befinden sich die S-Layer Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des xyl Promotors. Transformanten von B. subtilis mit einem im Chromosom integrierten S-Layergen zeigten eine durch Zugabe von Xylose zum Wachstumsmedium induzierbare Expression von großen Mengen an S-Layerproteinen im Überstand der Zellen. Dies zeigt, daß die Signalsequenzen von sbsA und sbsB von der B. subtilis Zelle erkannt werden.

- 29 -

Auf analoge Weise konnte eine heterologe Expression rekombinanter sbsA und sbsB Layergene in *B. subtilis* erreicht werden.

- 30 -

SEQUENZPROTOKOLL

s (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Werner Lubitz
- (B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7
- 10 (C) ORT: Wien
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 1080

- (A) NAME: Uwe Sleytr
- 15 (B) STRASSE: Parhamerplatz 10
- (C) ORT: Wien
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 1170

- 20 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Expression
von S-Layer-Proteinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

25 (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- 30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3687 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- 40 (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
- 45 (B) STAMM: PV72

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): sbsA

50

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- 55 (B) LÄNGE: 1..3684

- 31 -

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide

(B) LAGE:1..90

5

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:91..3684

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

	ATG GAT AGG AAA AAA GCT GTG AAA CTA GCA ACA GCA AGT GCT ATT GCA	48
	Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala	
15	-30 -25 -20 -15	
	GCA AGT GCA TTT GTC GCT GCA AAT CCA AAC GCT TCT GAA GCG GCT ACA	96
	Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr	
	-10 -5 1	
20	GAT GTA GCA ACA GTA GTA AGC CAA GCA AAA GCA CAG TTC AAA AAA GCA	144
	Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala	
	5 10 15	
25	TAC TAT ACT TAC AGC CAT ACA GTA ACG GAA ACT GGT GAA TTC CCA AAC	192
	Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn	
	20 25 30	
	ATT AAC GAT GTA TAT GCT GAA TAC AAC AAA GCG AAA AAA CGA TAC CGT	240
30	Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg	
	35 40 45 50	
	GAT GCG GTA GCA TTA GTG AAT AAA GCA GGT GGC GCG AAA AAA GAC GCT	288
	Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala	
35	55 60 65	
	TAC TTA GCT GAT TTA CAA AAA GAA TAT GAA ACT TAC GTT TTC AAA GCA	336
	Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala	
	70 75 80	
40	AAC CCT AAA TCT GGC GAA GCT CGT GTA GCA ACT TAC ATC GAT GCT TAC	384
	Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr	
	85 90 95	
45	AAC TAT GCA ACA AAA TTA GAC GAA ATG CGC CAA GAG CTA GAG GCT GCT	432
	Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala	
	100 105 110	
	GTT CAA GCA AAA GAT TTA GAA AAA GCA GAA CAA TAC TAT CAC AAA ATT	480
50	Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile	
	115 120 125 130	
	CCT TAT GAA ATT AAA ACT CGC ACA GTC ATT TTA GAT CGC GTA TAT GGT	528
	Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly	
55	135 140 145	
	AAA ACA ACT CGT GAT TTA CTT CGC TCT ACA TTT AAA GCA AAA GCA CAA	576
	Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln	
	150 155 160	
60	GAA CTT CGC GAC AGC TTA ATT TAT GAT ATT ACC GTT GCA ATG AAA GCG	624
	Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala	
	165 170 175	

65

- 32 -

	CGC GAA GTA CAA GAC GCT GTG AAA GCA GGC AAT TTA GAC AAA GCT AAA Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys 180 185 190	672
5	GCT GCT GTT GAT CAA ATC AAT CAA TAC TTA CCA AAA GTA ACA GAT GCT Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala 195 200 205 210	720
10	TTC AAA ACT GAA CTA ACA GAA GTA GCG AAA AAA GCA TTA GAT GCA GAT Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp 215 220 225	768
15	GAA GCT GCG CTT ACT CCA AAA GTT GAA AGT GTA AGT GCG ATT AAC ACT Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr 230 235 240	816
	CAA AAC AAA GCT GTT GAA TTA ACA GCA GTA CCA GTG AAC GGA ACA CTA Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu 245 250 255	864
20	AAA TTA CAA CTT TCA GCT GCT GCA AAT GAA GAT ACA GTA AAC GTA AAT Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn 260 265 270	912
25	ACT GTA CGT ATC TAT AAA GTG GAC GGT AAC ATT CCA TTT GCC CTT AAT Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn 275 280 285 290	960
30	ACG GCA GAT GTT TCT TTA TCT ACA GAC GGA AAA ACT ATC ACT GTG GAT Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp 295 300 305	1008
35	GCT TCA ACT CCA TTC GAA AAT AAT ACG GAG TAT AAA GTA GTA GTT AAA Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys 310 315 320	1056
	GGT ATT AAA GAC AAA AAT GGC AAA GAA TTT AAA GAA GAT GCA TTC ACT Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr 325 330 335	1104
40	TTC AAG CTT CGA AAT GAT GCT GTA GTT ACT CAA GTG TTT GGA ACT AAT Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn 340 345 350	1152
45	GTA ACA AAC AAC ACT TCT GTA AAC TTA GCA GCA GGT ACT TTC GAC ACT Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr 355 360 365 370	1200
50	GAC GAT ACT TTA ACA GTA GTA TTT GAT AAG TTG TTA GCA CCT GAA ACT Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr 375 380 385	1248
55	GTA AAC AGC TCG AAC GTT ACT ATT ACA GAT GTT GAA ACT GGA AAA CGC Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg 390 395 400	1296
	ATT CCA GTA ATT GCA TCT ACT TCT GGT TCT ACA ATT ACT ATT ACG TTA Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu 405 410 415	1344
60	AAA GAA GCG TTA GTA ACT GGT AAA CAA TAT AAA CTT GCT ATC AAT AAT Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn 420 425 430	1392
65	GTT AAA ACA TTA ACT GGT TAC AAT GCA GAA GCT TAC GAG TTA GTG TTC Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe 435 440 445 450	1440

- 33 -

	ACT	GCA	AAC	GCA	TCA	GCA	CCA	ACT	GTT	GCT	ACC	GCT	CCT	ACT	ACT	TTA	1488
	Thr	Ala	Asn	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Val	Ala	Thr	Ala	Pro	Thr	Thr	Leu	
				455						460						465	
5	GGT	GGT	ACA	ACT	TTA	TCT	ACT	GGT	TCT	CTT	ACA	ACA	AAT	GTT	TGG	GGT	1536
	Gly	Gly	Thr	Thr	Leu	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Thr	Thr	Asn	Val	Trp	Gly	
				470					475					480			
	AAA	TTG	GCT	GGT	GGT	GTG	AAT	GAA	GCT	GGA	ACT	TAT	TAT	CCT	GGT	CTT	1584
10	Lys	Leu	Ala	Gly	Gly	Val	Asn	Glu	Ala	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Leu	
			485					490					495				
	CAA	TTC	ACA	ACA	ACG	TTT	GCT	ACT	AAG	TTA	GAC	GAA	TCT	ACT	TTA	GCT	1632
15	Gln	Phe	Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Thr	Lys	Leu	Asp	Glu	Ser	Thr	Leu	Ala	
		500					505					510					
	GAT	AAC	TTT	GTA	TTA	GTT	GAA	AAA	GAA	TCT	GGT	ACA	GTT	GTT	GCT	TCT	1680
	Asp	Asn	Phe	Val	Leu	Val	Glu	Lys	Glu	Ser	Gly	Thr	Val	Val	Ala	Ser	
	515					520					525					530	
20	GAA	CTA	AAA	TAT	AAT	GCA	GAC	GCT	AAA	ATG	GTA	ACT	TTA	GTG	CCA	AAA	1728
	Glu	Leu	Lys	Tyr	Asn	Ala	Asp	Ala	Lys	Met	Val	Thr	Leu	Val	Pro	Lys	
					535					540					545		
25	GCG	GAC	CTT	AAA	GAA	AAT	ACA	ATC	TAT	CAA	ATC	AAA	ATT	AAA	AAA	GGC	1776
	Ala	Asp	Leu	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ile	Lys	Lys	Gly	
				550					555					560			
	TTG	AAG	TCC	GAT	AAA	GGT	ATT	GAA	TTA	GGC	ACT	GTT	AAC	GAG	AAA	ACA	1824
30	Leu	Lys	Ser	Asp	Lys	Gly	Ile	Glu	Leu	Gly	Thr	Val	Asn	Glu	Lys	Thr	
			565					570					575				
	TAT	GAG	TTC	AAA	ACT	CAA	GAC	TTA	ACT	GCT	CCT	ACA	GTT	ATT	AGC	GTA	1872
35	Tyr	Glu	Phe	Lys	Thr	Gln	Asp	Leu	Thr	Ala	Pro	Thr	Val	Ile	Ser	Val	
		580					585					590					
	ACG	TCT	AAA	AAT	GGC	GAC	GCT	GGA	TTA	AAA	GTA	ACT	GAA	GCT	CAA	GAA	1920
	Thr	Ser	Lys	Asn	Gly	Asp	Ala	Gly	Leu	Lys	Val	Thr	Glu	Ala	Gln	Glu	
	595					600					605				610		
40	TTT	ACT	GTG	AAG	TTC	TCA	GAG	AAT	TTA	AAT	ACA	TTT	AAT	GCT	ACA	ACC	1968
	Phe	Thr	Val	Lys	Phe	Ser	Glu	Asn	Leu	Asn	Thr	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	
					615					620					625		
45	GTT	TCG	GGT	AGC	ACA	ATC	ACA	TAC	GGT	CAA	GTT	GCT	GTA	GTA	AAA	GCG	2016
	Val	Ser	Gly	Ser	Thr	Ile	Thr	Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Val	Val	Lys	Ala	
				630					635					640			
	GGT	GCA	AAC	TTA	TCT	GCT	CTT	ACA	GCA	AGT	GAC	ATC	ATT	CCA	GCT	AGT	2064
50	Gly	Ala	Asn	Leu	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Ile	Pro	Ala	Ser	
			645					650					655				
	GTT	GAA	GCG	GTT	ACT	GGT	CAA	GAT	GGA	ACA	TAC	AAA	GTG	AAA	GTT	GCT	2112
55	Val	Glu	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Asp	Gly	Thr	Tyr	Lys	Val	Lys	Val	Ala	
		660					665					670					
	GCT	AAC	CAA	TTA	GAA	CGT	AAC	CAA	GGG	TAC	AAA	TTA	GTA	GTG	TTC	GGT	2160
	Ala	Asn	Gln	Leu	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Phe	Gly	
	675					680					685					690	
60	AAA	GGT	GCA	ACA	GCT	CCT	GTT	AAA	GAT	GCT	GCA	AAT	GCA	AAT	ACT	TTA	2208
	Lys	Gly	Ala	Thr	Ala	Pro	Val	Lys	Asp	Ala	Ala	Asn	Ala	Asn	Thr	Leu	
					695				700						705		
65	GCA	ACT	AAC	TAT	ATC	TAT	ACA	TTT	ACA	ACT	GAA	GGT	CAA	GAC	GTA	ACA	2256
	Ala	Thr	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Glu	Gly	Gln	Asp	Val	Thr	
				710					715					720			

	GCA CCA ACG GTT ACA AAA GTA TTC AAA GGT GAT TCT TTA AAA GAC GCT	2304
	Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala	
	725 730 735	
5	GAT GCA GTT ACT ACA CTT ACG AAC GTT GAT GCA GGT CAA AAA TTC ACT	2352
	Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr	
	740 745 750	
10	ATC CAA TTT AGC GAA GAA TTA AAA ACT TCT AGT GGT TCT TTA GTG GGT	2400
	Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly	
	755 760 765 770	
15	GGC AAA GTA ACT GTC GAG AAA TTA ACA AAC AAC GGA TGG GTA GAT GCT	2448
	Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala	
	775 780 785	
20	GGT ACT GGA ACA ACT GTA TCA GTT GCT CCT AAG ACA GAT GCA AAT GGT	2496
	Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly	
	790 795 800	
25	AAA GTA ACA GCT GCT GTG GTT ACA TTA ACT GGT CTT GAC AAT AAC GAC	2544
	Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp	
	805 810 815	
30	AAA GAT GCG AAA TTG CGT CTG GTA GTA GAT AAG TCT TCT ACT GAT GGA	2592
	Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly	
	820 825 830	
35	ATT GCT GAT GTA GCT GGT AAT GTA ATT AAG GAA AAA GAT ATT TTA ATT	2640
	Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile	
	835 840 845 850	
40	CGT TAC AAC AGC TGG AGA CAC ACT GTA GCT TCT GTG AAA GCT GCT GCT	2688
	Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala	
	855 860 865	
45	GAC AAA GAT GGT CAA AAC GCT TCT GCT GCA TTC CCA ACA AGC ACT GCA	2736
	Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala	
	870 875 880	
50	ATT GAT ACA ACT AAG AGC TTA TTA GTT GAA TTC AAT GAA ACT GAT TTA	2784
	Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu	
	885 890 895	
55	GCG GAA GTT AAA CCT GAG AAC ATC GTT GTT AAA GAT GCA GCA GGT AAT	2832
	Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn	
	900 905 910	
60	GCG GTA GCT GGT ACT GTA ACA GCA TTA GAC GGT TCT ACA AAT AAA TTT	2880
	Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe	
	915 920 925 930	
65	GTA TTC ACT CCA TCT CAA GAA TTA AAA GCT GGT ACA GTT TAC TCT GTA	2928
	Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val	
	935 940 945	
70	ACA ATT GAC GGT GTG AGA GAT AAA GTA GGT AAC ACA ATC TCT AAA TAC	2976
	Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr	
	950 955 960	
75	ATT ACT TCG TTC AAG ACT GTA TCT GCG AAT CCA ACG TTA TCT TCA ATC	3024
	Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile	
	965 970 975	
80	AGC ATT GCT GAC GGT GCA GTT AAC GTT GAC CGT TCT AAA ACA ATT ACA	3072
	Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr	
	980 985 990	

- 35 -

ATT GAA TTC AGC GAT TCA GTT CCA AAC CCA ACA ATC ACT CTT AAG AAG 3120
 Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys
 995 1000 1005 1010

5 GCT GAC GGA ACT TCA TTT ACT AAT TAC ACT TTA GTA AAT GTA AAT AAT 3168
 Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn
 1015 1020 1025

GAA AAT AAA ACA TAC AAA ATT GTA TTC CAC AAA GGT GTA ACA CTT GAC 3216
 10 Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp
 1030 1035 1040

GAG TTT ACT CAA TAT GAG TTA GCA GTT TCA AAA GAT TTT CAA ACT GGT 3264
 15 Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly
 1045 1050 1055

ACT GAT ATT GAT AGC AAA GTT ACA TTC ATC ACA GGT TCT GTT GCT ACT 3312
 Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr
 1060 1065 1070

20 GAC GAA GTA AAA CCT GCT CTA GTA GGC GTT GGT TCA TGG AAT GGA ACA 3360
 Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr
 1075 1080 1085 1090

25 AGC TAT ACT CAG GAT GCT GCA GCA ACA CGA CTT CGG TCT GTA GCT GAC 3408
 Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp
 1095 1100 1105

TTC GTT GCG GAG CCA GTT GCC CTT CAA TTC TCA GAA GGT ATC GAT TTA 3456
 30 Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu
 1110 1115 1120

ACG AAT GCA ACT GTG ACA GTA ACA AAT ATT ACT GAT GAT AAA ACT GTT 3504
 35 Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val
 1125 1130 1135

GAA GTT ATT TCA AAA GAG AGT GTA GAC GCA GAC CAT GAT GCA GGT GCT 3552
 Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala
 1140 1145 1150

40 ACT AAG GAG ACA TTA GTA ATT AAC ACA GTT ACT CCT TTA GTA CTT GAT 3600
 Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp
 1155 1160 1165 1170

45 AAC AGC AAG ACT TAT AAG ATT GTT GTA AGT GGA GTT AAA GAT GCA GCA 3648
 Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala
 1175 1180 1185

GGT AAT GTT GCA GAT ACT ATT ACA TTC TAT ATT AAG TAA 3687
 50 Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys
 1190 1195

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1228 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

60

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

- 36 -

Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala
 -30 -25 -20 -15
 5 Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr
 -10 -5 1
 Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala
 5 10 15
 10 Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn
 20 25 30
 Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg
 15 35 40 45 50
 Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala
 55 60 65
 20 Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala
 70 75 80
 Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr
 85 90 95
 25 Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala
 100 105 110
 Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile
 30 115 120 125 130
 Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly
 135 140 145
 35 Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln
 150 155 160
 Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala
 165 170 175
 40 Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys
 180 185 190
 Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala
 45 195 200 205 210
 Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp
 215 220 225
 50 Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr
 230 235 240
 Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu
 245 250 255
 55 Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn
 260 265 270
 Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn
 60 275 280 285 290
 Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp
 295 300 305
 65 Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys
 310 315 320

- 37 -

Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr
 325 330 335
 5 Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn
 340 345 350
 Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr
 355 360 365 370
 10 Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr
 375 380 385
 Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg
 390 395 400
 15 Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu
 405 410 415
 Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn
 20 420 425 430
 Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe
 435 440 445 450
 25 Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu
 455 460 465
 Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly
 470 475 480
 30 Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu
 485 490 495
 Gln Phe Thr Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala
 35 500 505 510
 Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser
 515 520 525 530
 40 Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys
 535 540 545
 Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly
 550 555 560
 45 Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr
 565 570 575
 Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val
 50 580 585 590
 Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu
 595 600 605 610
 55 Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr
 615 620 625
 Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala
 630 635 640
 60 Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser
 645 650 655
 Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala
 65 660 665 670

- 38 -

Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly
 675 680 685 690
 Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu
 5 695 700 705
 Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr
 710 715 720
 10 Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala
 725 730 735
 Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr
 740 745 750
 15 Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly
 755 760 765 770
 Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala
 20 775 780 785
 Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly
 790 795 800
 25 Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp
 805 810 815
 Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly
 820 825 830
 30 Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile
 835 840 845 850
 Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala
 35 855 860 865
 Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala
 870 875 880
 40 Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu
 885 890 895
 Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn
 900 905 910
 45 Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe
 915 920 925 930
 Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val
 50 935 940 945
 Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr
 950 955 960
 55 Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile
 965 970 975
 Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr
 980 985 990
 60 Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys
 995 1000 1005 1010
 Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn
 65 1015 1020 1025

- 39 -

Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp
 1030 1035 1040
 Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly
 5 1045 1050 1055
 Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr
 1060 1065 1070
 10 Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr
 1075 1080 1085 1090
 Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp
 1095 1100 1105
 15 Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu
 1110 1115 1120
 Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val
 20 1125 1130 1135
 Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala
 1140 1145 1150
 25 Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp
 1155 1160 1165 1170
 Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala
 1175 1180 1185
 30 Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys
 1190 1195

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 40 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45

TTAATCGATT CTAGATGGAT AGGAAAAAAG CTG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 55 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

60

- 40 -

ATACCCGGGG GTACGGATCC GATACAGATT TGAGCAA

37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2766 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

10

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
 (B) STAMM: PV72

15

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): sbsB

20

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LÄNGE: 1..2763

25

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
 (B) LÄNGE: 1..93

30

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LÄNGE: 94..2763

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

40	ATG GCT TAT CAA CCT AAG TCT TTT CGC AAG TTT GTT GCG ACA ACT GCA	48
	Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala	
	-31 -30 -25 -20	
45	ACA GCT GCC ATT GTA GCA TCT GCG GTA GCT CCT GTA GTA TCT GCA GCA	96
	Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala	
	-15 -10 -5 1	
50	AGC TTC ACA GAT GTT GCG CCG CAA TAT AAA GAT GCG ATC GAT TTC TTA	144
	Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu	
	5 10 15	
55	GTA TCA ACT GGT GCA ACA AAA GGT AAA ACA GAA ACA AAA TTC GGC GTT	192
	Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val	
	20 25 30	
60	TAC GAT GAA ATC ACT CGT CTA GAT GCG GCA GTT ATT CTT GCA AGA GTA	240
	Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val	
	35 40 45	

60

- 41 -

	TTA AAA CTA GAC GTT GAC AAC GCA AAA GAC GCA GGC TTC ACA GAT GTG	288
	Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val	
	50 55 60 65	
5	CCA AAA GAC CGT GCA AAA TAC GTC AAC GCG CTT GTA GAA GCT GGC GTA	336
	Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val	
	70 75 80	
10	TTA AAC GGT AAA GCA CCT GGC AAA TTT GGT GCA TAC GAC CCA TTA ACT	384
	Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr	
	85 90 95	
15	CGC GTT GAA ATG GCA AAA ATC ATC GCG AAC CGT TAC AAA TTA AAA GCT	432
	Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala	
	100 105 110	
20	GAC GAT GTA AAA CTT CCA TTC ACT GAT GTA AAC GAT ACA TGG GCA CCA	480
	Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro	
	115 120 125	
25	TAC GTA AAA GCG CTT TAT AAA TAC GAA GTA ACC AAA AGG TTA AAA CAC	528
	Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His	
	130 135 140 145	
30	CAA CAA GCT TCG GTG CAT ACC AAA AAC ATC ACT CTG CGT GAC TTT GCG	576
	Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala	
	150 155 160	
35	CAA TTT GTA TAT AGA GCG GTG AAT ATT AAT GCA GTG CCA GAA ATA GTT	624
	Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val	
	165 170 175	
40	GAA GTA ACT GCG GTT AAT TCG ACT ACA GTG AAA GTA ACA TTC AAT ACG	672
	Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr	
	180 185 190	
45	CAA ATT GCT GAT GTT GAT TTC ACA AAT TTT GCT ATC GAT AAC GGT TTA	720
	Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu	
	195 200 205	
50	ACT GTT ACT AAA GCA ACT CTT TCT CGT GAT AAA AAA TCC GTA GAG GTT	768
	Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val	
	210 215 220 225	
55	GTG GTA AAT AAA CCG TTT ACT CGT AAT CAG GAA TAT ACA ATT ACA GCG	816
	Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala	
	230 235 240	
60	ACA GGC ATT AAA AAT TTA AAA GGC GAG ACC GCT AAG GAA TTA ACT GGT	864
	Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly	
	245 250 255	
65	AAG TTT GTT TGG TCT GTT CAA GAT GCG GTA ACT GTT GCA CTA AAT AAT	912
	Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn	
	260 265 270	
70	AGT TCG CTT AAA GTT GGA GAG GAA TCT GGT TTA ACT GTA AAA GAT CAG	960
	Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln	
	275 280 285	
75	GAT GGC AAA GAT GTT GTA GGT GCT AAA GTA GAA CTT ACT TCT TCT AAT	1008
	Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn	
	290 295 300 305	
80	ACT AAT ATT GTT GTA GTT TCA AGT GGC GAA GTA TCA GTA TCT GCT GCT	1056
	Thr Asn Ile Val Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala	
	310 315 320	

- 42 -

	AAA GTT ACA GCT GTA AAA CCG GGA ACA GCT GAT GTT ACT GCA AAA GTT	1104
	Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val	
	325 330 335	
5	ACA TTA CCA GAT GGT GTT GTA CTA ACA AAT ACA TTT AAA GTG ACA GTT	1152
	Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val	
	340 345 350	
10	ACA GAA GTG CCT GTT CAA GTC CAA AAT CAA GGA TTT ACT TTA GTT GAT	1200
	Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp	
	355 360 365	
15	AAT CTT TCT AAT GCT CCA CAG AAT ACA GTT GCA TTT AAC AAA GCT GAG	1248
	Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu	
	370 375 380 385	
	AAA GTA ACT TCA ATG TTT GCT GGA GAA ACT AAA ACA GTT GCA ATG TAT	1296
	Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr	
	390 395 400	
20	GAT ACT AAA AAC GGT GAT CCT GAA ACT AAA CCT GTT GAT TTC AAA GAT	1344
	Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp	
	405 410 415	
25	GCA ACT GTA CGT TCA TTA AAT CCA ATT ATT GCA ACA GCT GCT ATT AAT	1392
	Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn	
	420 425 430	
30	GGT AGT GAG CTC CTT GTC ACA GCT AAT GCT GGC CAA TCT GGA AAA GCT	1440
	Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala	
	435 440 445	
35	TCA TTT GAA GTA ACA TTA AAA GAT AAT ACA AAA AGA ACA TTT ACA GTT	1488
	Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val	
	450 455 460 465	
	GAT GTA AAA AAA GAC CCT GTA TTA CAA GAT ATA AAA GTA GAT GCA ACT	1536
	Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr	
	470 475 480	
40	TCT GTT AAA CTT TCC GAT GAA GCT GTT GGC GGC GGG GAA GTT GAA GGA	1584
	Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly	
	485 490 495	
45	GTT AAC CAA AAA ACG ATT AAA GTA AGT GCA GTT GAC CAA TAC GGT AAA	1632
	Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys	
	500 505 510	
50	GAA ATT AAA TTT GGT ACA AAA GGT AAA GTT ACT GTT ACA ACT AAT ACA	1680
	Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr	
	515 520 525	
55	GAA GGA CTA GTT ATT AAA AAT GTA AAT AGC GAT AAT ACA ATT GAC TTT	1728
	Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe	
	530 535 540 545	
	GAT AGC GGC AAT AGT GCA ACT GAC CAA TTT GTT GTC GTT GCA ACA AAA	1776
	Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys	
	550 555 560	
60	GAC AAA ATT GTC AAT GGT AAA GTA GAA GTT AAA TAT TTC AAA AAT GCT	1824
	Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala	
	565 570 575	
65	AGT GAC ACA ACA CCA ACT TCA ACT AAA ACA ATT ACT GTT AAT GTA GTA	1872
	Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val	
	580 585 590	

- 43 -

	AAT GTA AAA GCT GAC GCT ACA CCA GTA GGA TTA GAT ATT GTA GCA CCT	1920
	Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro	
	595 600 605	
5	TCT AAA ATT GAT GTA AAT GCT CCA AAC ACT GCT TCT ACT GCA GAT GTT	1968
	Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val	
	610 615 620 625	
	GAT TTT ATA AAT TTC GAA AGT GTT GAG ATT TAC ACA CTC GAT TCA AAT	2016
10	Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn	
	630 635 640	
	GGT AGA CGT CAA AAA AAA GTT ACT CCA ACT GCA ACT ACA CTT GTA GGT	2064
15	Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly	
	645 650 655	
	ACA AAA AAA AAA AAA AAA GTT AAT GGG AAT GTA TTA CAA TTC AAG GGG	2112
	Thr Lys Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly	
	660 665 670	
20	AAC GAA GAA TTA ACG CTA TCA ACT TCT TCT AGT ACA GGA AAC GTA GAT	2160
	Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp	
	675 680 685	
25	GGA ACA GCA GAA GGA ATG ACA AAA CGT ATT CCA GGG AAA TAT ATC AAC	2208
	Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn	
	690 695 700 705	
	TCT GCA AGT GTA CCT GCC AGT GCA ACA GTA GCA ACA AGT CCT GTT ACT	2256
30	Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr	
	710 715 720	
	GTA AAG CTT AAT TCA AGT GAT AAT GAT TTA ACA TTT GAA GAA TTA ATA	2304
35	Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile	
	725 730 735	
	TTC GGT GTA ATT GAC CCT ACA CAA TTA GTC AAA GAT GAA GAC ATC AAC	2352
	Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn	
	740 745 750	
40	GAA TTT ATT GCA GTT TCA AAA GCG GCT AAA AAT GAT GGA TAT TTG TAT	2400
	Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr	
	755 760 765	
45	AAT AAA CCG CTT GTA ACG GTT AAA GAT GCA TCA GGA AAA GTT ATT CCA	2448
	Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro	
	770 775 780 785	
	ACA GGT GCA AAT GTT TAC GGT CTA AAT CAT GAT GCA ACT AAC GGA AAC	2496
50	Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn	
	790 795 800	
	ATT TGG TTT GAT GAG GAA CAA GCT GGC TTA GCT AAA AAA TTT AGT GAT	2544
55	Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp	
	805 810 815	
	GTA CAT TTT GAT GTT GAT TTT TCA TTA ACT AAC GTT GTA AAA ACT GGT	2592
	Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly	
	820 825 830	
60	AGC GGT ACA GTT TCT TCA TCG CCA TCA TTA TCT GAC GCA ATT CAA CTT	2640
	Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu	
	835 840 845	
65	ACT AAT TCA GGC GAT GCA GTA TCG TTT ACA TTA GTT ATC AAA TCA ATT	2688
	Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile	
	850 855 860 865	

- 44 -

TAT GTT AAA GGC GCA GAT AAA GAT GAT AAT AAC TTA CTT GCA GCC CCT 2736
 Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro
 870 875 880

5 GTT TCT GTC AAT GTG ACT GTG ACA AAA TAA 2766
 Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
 885 890

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 921 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala
 25 -31 -30 -25 -20
 Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala
 -15 -10 -5 1
 30 Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu
 5 10 15
 Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val
 20 25 30
 35 Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val
 35 40 45
 40 Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val
 50 55 60 65
 Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val
 70 75 80
 45 Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr
 85 90 95
 Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala
 100 105 110
 50 Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro
 115 120 125
 Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His
 55 130 135 140 145
 Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala
 150 155 160
 60 Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val
 165 170 175
 Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr
 180 185 190

- 45 -

Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu
 195 200 205
 Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val
 5 210 215 220 225
 Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala
 230 235 240
 10 Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly
 245 250 255
 Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn
 260 265 270
 15 Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln
 275 280 285
 Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn
 20 290 295 300 305
 Thr Asn Ile Val Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala
 310 315 320
 25 Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val
 325 330 335
 Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val
 340 345 350
 30 Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp
 355 360 365
 Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu
 35 370 375 380 385
 Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr
 390 395 400
 40 Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp
 405 410 415
 Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn
 420 425 430
 45 Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala
 435 440 445
 Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val
 50 450 455 460 465
 Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr
 470 475 480
 55 Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly
 485 490 495
 Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys
 500 505 510
 60 Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr
 515 520 525
 Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe
 65 530 535 540 545

- 46 -

Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys
 550 555 560
 Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala
 5 565 570 575
 Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val
 580 585 590
 10 Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro
 595 600 605
 Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val
 610 615 620 625
 15 Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn
 630 635 640
 Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly
 20 645 650 655
 Thr Lys Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly
 660 665 670
 25 Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp
 675 680 685
 Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn
 690 695 700 705
 30 Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr
 710 715 720
 Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile
 15 725 730 735
 Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn
 740 745 750
 40 Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr
 755 760 765
 Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro
 770 775 780 785
 45 Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn
 790 795 800
 Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp
 50 805 810 815
 Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly
 820 825 830
 55 Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu
 835 840 845
 Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile
 850 855 860 865
 60 Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro
 870 875 880
 Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
 65 885 890

- 47 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 5 (A) LÄNGE: 498 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

15	CCCATGGACC CGTCCAAGGA CTCCAAGCT CAGGTTTCTG CAGCCGAAGC TGGTATCACT	60
	GGCACCTGGT ATAACCAACT GGGGTCGACT TTCATTGTGA CCGCTGGTGC GGACGGAGCT	120
	CTGACTGGCA CCTACGAATC TGCGGTTGGT AACGCAGAAT CCCGCTACGT ACTGACTGGC	180
20	CGTTATGACT CTGCACCTGC CACCGATGGC TCTGGTACCG CTCTGGGCTG GACTGTGGCT	240
	TGGAAAAACA ACTATCGTAA TGCACACAGC GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATACGTTGGC	300
	GGTGCTGAGG CTCGTATCAA CACTCAGTGG CTGTTAACAT CCGGCACTAC CGAAGCGAAT	360
25	GCATGGAAAT CGACACTAGT AGGTCATGAC ACCTTTACCA AAGTTAAGCC TTCTGCTGCT	420
	AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGCGTA AACACGGTA ACCCTCTAGA CGCTGTTTCAG	480
30	CAATAATAAG GATCCGGG	498

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 40 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

45	TTCATCGTAA ACGCCGAATT TTGTTTCTG	29
----	---------------------------------	----

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

60	AGGGAAATAT ATCAACTCTG CAAGTG	26
----	------------------------------	----

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man
(a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle
bereitstellt, die transformiert ist mit einer für
ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, aus-
gewählt aus
10 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1
bis Position 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nu-
kleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signal-
peptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nuklein-
15 säure aus (i) im Rahmen der Degeneration des
genetischen Codes entsprechende Nukleotidse-
quenz umfaßt, und
(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den
Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter
20 stringenten Bedingungen hybridisierende
Nukleotidsequenz umfaßt;
(b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen
kultiviert, die zu einer Expression der
Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon
25 kodierten Polypeptids führen und
(c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle ge-
winnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man eine E.coli-Wirtszelle verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
35 daß man das Polypeptid in Form einer assemblierten S-
Layer-Struktur aus dem Inneren der Wirtszelle gewinnt.

- 49 -

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure
eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid-
s oder Polypeptidsequenzen kodieren.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen ausgewählt werden aus Nukleotidse-
10 quenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren
geladenen Aminosäuren oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epi-
tope, metallbindende Epitope, immunogene Epitope, aller-
gene Epitope, antigene Epitope, Streptavidin, Enzyme,
Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.
- 15 6. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für Streptavidin kodieren.
- 20 7. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für immunogene Epitope aus Herpesvi-
ren, insbesondere Herpesvirus 6 oder FMDV, kodieren.
- 25 8. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für Enzyme, wie etwa Polyhydroxybut-
tersäuresynthase oder bakterielle Luciferase, kodieren.
- 30 9. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für Cytokine, wie etwa Interleukine,
Interferone oder Tumornekrosefaktoren, kodieren.
- 35 10. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

- 50 -

daß die Insertionen für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein A oder Protein G, kodieren.

11. Verfahren nach Anspruch 5,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für antigene Epitope kodieren, die an Cytokine oder Endotoxine binden.
12. Verfahren nach Anspruch 5,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für metallbindende Epitope kodieren.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß 5'-seitig der für das S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure in operativer Verknüpfung eine für ein gram-positives Signalpeptid kodierende Nukleinsäure angeordnet ist.
- 20 14. Verfahren nach Anspruch 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure
(a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ
ID NO.1 dargestellten Nukleotidsequenz,
25 (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration
des genetischen Codes entsprechende Nukleotid-
sequenz oder/und
(c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% homologe Nukleotidsequenz umfaßt.
- 30 15. Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus
(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis
3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegeben-
35 enenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

- 51 -

- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt, wobei die Nukleinsäure innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.
- 10
16. Nukleinsäure nach Anspruch 15,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionsstelle an Position 582, 878, 917, 2504 oder/und 2649 der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleotidsequenz lokalisiert ist.
- 15
17. Vektor,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 enthält.
- 20
18. Zelle,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 oder einem Vektor nach Anspruch 17 transformiert ist.
- 25
19. Zelle nach Anspruch 18,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie eine gram-negative prokaryontische Zelle, insbesondere eine E.coli-Zelle ist.
- 30
20. Zelle nach Anspruch 18 oder 19,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie eine rekombinante S-Layer-Struktur enthält.
- 35
21. Rekombinantes S-Layer-Protein,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

- 52 -

daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 kodiert ist.

22. Rekombinante S-Layer-Struktur,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
 daß sie als Untereinheit mindestens ein Protein nach
 Anspruch 21 enthält.
23. S-Layer-Struktur nach Anspruch 22,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
 daß sie weiterhin als Untereinheit mindestens ein nicht-
 modifiziertes S-Layer-Protein enthält.
24. S-Layer-Struktur nach Anspruch 22 oder 23,
15 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
 daß sie mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung
 miteinander verknüpfte Schichten umfaßt.
25. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 21 oder
20 einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 22 bis
 24 als Vakzin oder Adjuvans.
26. Verwendung nach Anspruch 25,
 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
25 daß das Vakzin oder Adjuvans weiterhin einen Bakterien-
 ghost umfaßt, der gegebenenfalls in seiner Membran weitere
 immunogene Epitope enthält.
27. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 21 oder
30 einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 22 bis
 24 als Enzymreaktor.
28. Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und
 ausgewählt ist aus
35 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis
 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz ge-

- 53 -

gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

29. Nukleinsäure nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.

30. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 28 oder 29 enthält.

31. Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 28 oder 29 oder einem Vektor nach Anspruch 30 transformiert ist.

32. Zelle nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine rekombinante S-Layer-Struktur enthält.

33. S-Layer-Protein,
dadurch gekennzeichnet,
daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 29 kodiert ist.

- 54 -

34. Rekombinante S-Layer-Struktur,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie als Untereinheit mindestens ein rekombinantes S-
Layer-Protein enthält, das von einer Nukleinsäure nach
5 Anspruch 29 kodiert ist.
35. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 33 oder
einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 34 als Vakzin oder
Adjuvans.
- 10 36. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 33 oder
einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 34 als Enzymreak-
tor.
- 15 37. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten S-Layer-Pro-
teinen,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
- 20 (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-
Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die
innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden
Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende
Insertion enthält,
- 25 (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen
kultiviert, die zu einer Expression der
Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon ko-
dierten Polypeptids führen, und
- (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle
oder dem Kulturmedium gewinnt.
- 30 38. Verfahren nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende
Nukleinsäure ausgewählt wird aus
- 35 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis
3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gege-

- 55 -

benenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

10 39. Verfahren nach Anspruch 37,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

25 40. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-39,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß in der Wirtszelle ein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert.

30

41. Verfahren nach Anspruch 40,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.

35

- 56 -

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-39,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen expri-
miert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Pro-
5 tein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem re-
kombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur
auszubilden.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-42,
10 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man eine prokaryontische Wirtszelle verwendet.
44. Verfahren nach Anspruch 43,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
15 daß man eine gram-positive Wirtszelle verwendet.
45. Verfahren nach Anspruch 44,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man B.stearothermophilus verwendet.

20

Fig.1

1/3

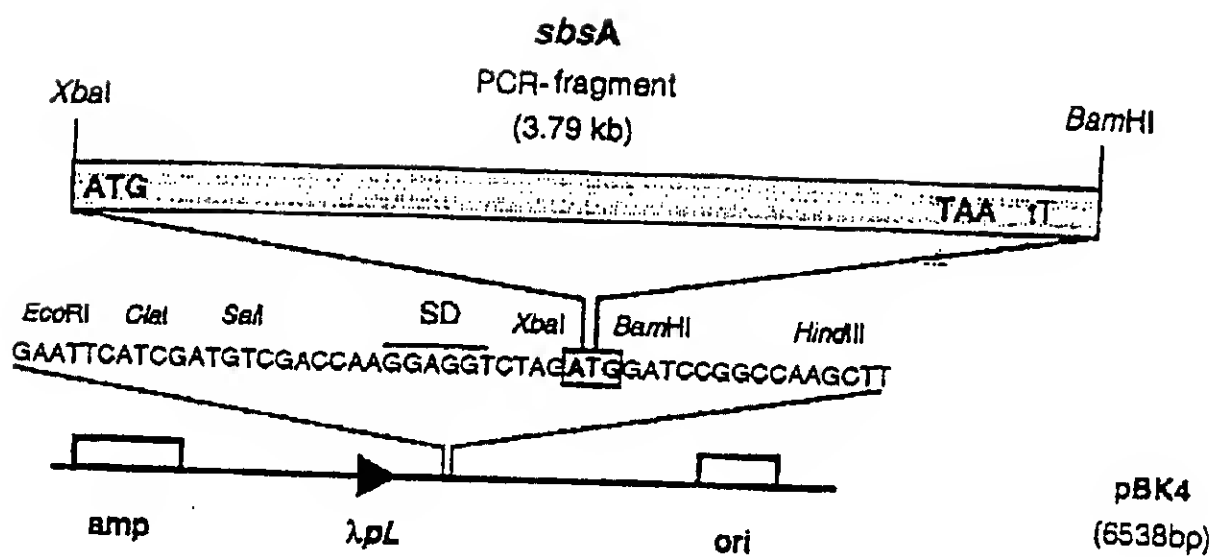


Fig.2

2/3

A)



B)



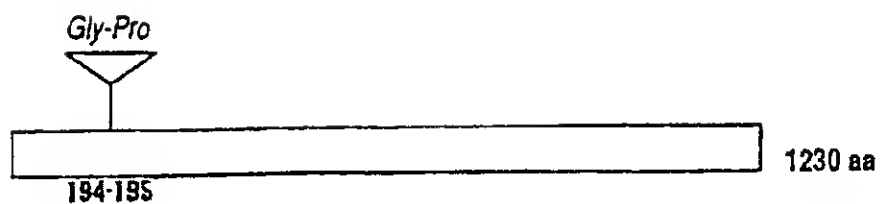
C)



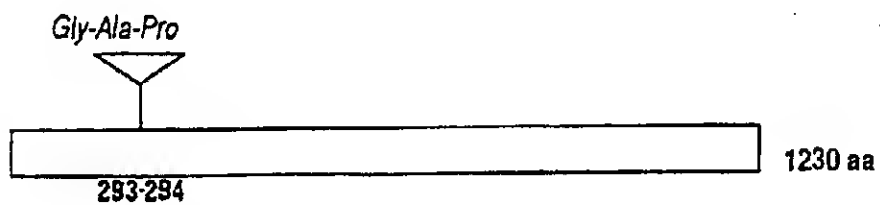
Fig.3

3/3

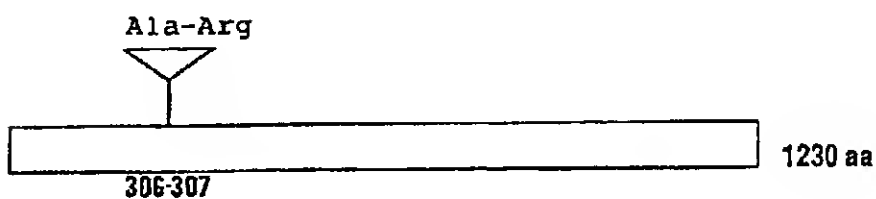
A)



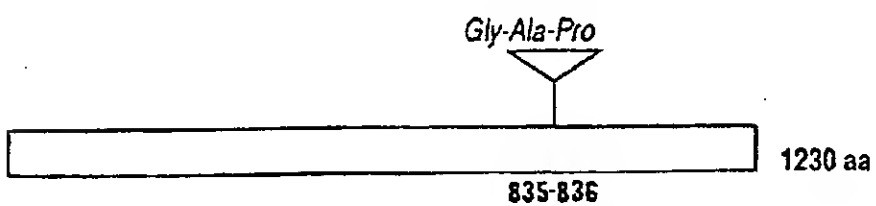
B)



C)



D)



E)

